



Condensation d'ADN plasmidique par des diamines sur un substrat de graphite HOPG

Omar Boulanouar, Pierre Cloutier, Léon Sanche, Michel Fromm

► To cite this version:

Omar Boulanouar, Pierre Cloutier, Léon Sanche, Michel Fromm. Condensation d'ADN plasmidique par des diamines sur un substrat de graphite HOPG. 79 ième congrès de l'ACFAS, May 2011, Sherbrooke, Canada. hal-00862423

HAL Id: hal-00862423

<https://hal.science/hal-00862423>

Submitted on 16 Sep 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Condensation d'ADN plasmidique par des diamines sur un substrat de graphite HOPG.



LCPR-AC

Omar Boulanouar^b, Pierre Cloutier^a, Léon Sanche^a, Michel Fromm^b

^(a) Groupe de Recherche en Sciences des Radiations, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec J1H 5N4, Canada

^(b) Laboratoire de Chimie-Physique et Rayonnements - Alain Chabaudet (LCPR-AC), UMR CEA E4, Université de Franche-Comté, 16 route de Gray, F-25030 Besançon France

UNIVERSITÉ DE
SHERBROOKE

Faculté de médecine
et des sciences de la santé



IRSC CIHR
Instituts de recherche
en santé du Canada Canadian Institutes of
Health Research

Résumé

Ce travail vise à améliorer notre connaissance des effets produits par les électrons de basse énergie (EBEs) sur l'ADN. Parmi les composants radiosensibles, les acides nucléiques demeurent en effet une cible critique des EBEs^[1]. Ce type d'étude requiert un bon étalement et un contrôle des dépôts d'ADN plasmidique sur des surfaces conductrices. Nous avons étudié en détails la formation de complexes entre des polyamines et l'ADN plasmidique.

Une partie du travail a consisté à caractériser les dépôts réalisés sur des substrats de graphite pyrolytique hautement orienté (HOPG) en employant des diamines pour condenser l'ADN. Nous avons montré que dans les conditions opératoires de cette étude, il est possible de créer des dépôts avec des épaisseurs calibrées, présentant un taux dégâts constant et suffisamment bas pour permettre des études ultérieures en gel d'électrophorèse. Ces dépôts, dont l'épaisseur varie de deux à plusieurs dizaines de nanomètres, ont la propriété remarquable de pouvoir être re-dissous dans l'eau sans qu'ils ne subissent de dommages supplémentaires.

Les dépôts réalisés avec le diaminopropane ont été exposés aux EBEs et une première exploitation par désorption stimulée (ESD) et par relaxation de plasmide a été effectuée. Ces premiers résultats ouvrent de larges perspectives pour l'utilisation ultérieure des dépôts créés durant ce travail.

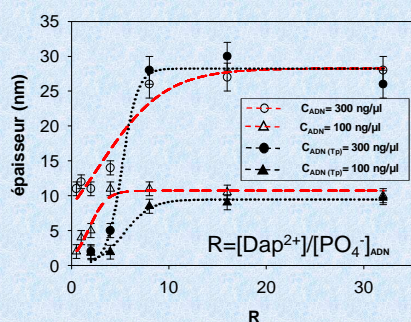
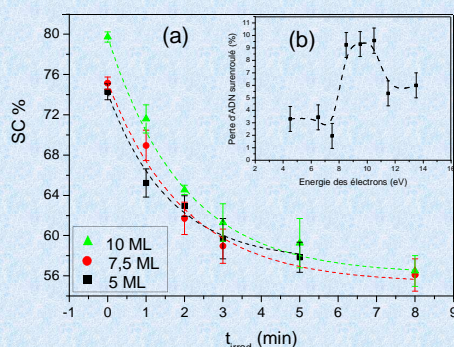


Figure (3) Evolution de l'épaisseur du dépôt ADN-Dap en fonction de R pour deux concentrations d'ADN : 100 et 300 ng/μl avec et sans tampon TE. Résultats obtenus par « AFM-scratching ».



Figure(5) a) Evolution de la forme surenroulée en fonction du temps d'irradiation. Les courbes en pointillé correspondent à des régressions exponentielles. b) Perte d'ADN surenroulé en fonction de l'énergie des électrons incidents. Mesures obtenues sur des dépôts de complexe ADNTE-Dap d'une épaisseur de 20nm (10 ML), irradiés par des EBEs pendant un temps $t = 1,5$ min.

Conclusion

La méthode de dépôt proposée dans cette étude a permis l'élaboration de films d'ADN uniformes et bien calibrés. L'analyse des dommages radio-induit montre une grande sensibilité de ces films d'ADN aux électrons de basse énergie:

- une sensibilité à l'énergie incidente « structures résonantes dans le cas des cassures simple brin(SSB) et les anions négatifs ».
- Une sensibilité à la dose « la section efficace effective de production de SSB ($6 \times 10^{-14} \text{ cm}^{-1}$) est supérieure à celles publiées dans la littérature^[2,3] ».

Méthode de dépôt

But: Déposer de l'ADN plasmidique (pUC21,3266pb) sur un substrat conducteur sous forme de films uniformes ayant des épaisseurs bien calibrées.

- Le graphite HOPG: surface hydrophobe, plane à l'échelle atomique
- Condensation de l'ADN par complexation avec les Diamines: Diaminopropane dichlorhydrate (Dap).



Figure (1) Représentation schématique de la méthode de dépôt utilisée

Caractérisation des dépôts ADN-Dap

Caractérisation des dépôts par microscopie à force atomique:

- Morphologie et homogénéité en mode tapping
- Mesure d'épaisseur par AFM en mode contact « AFM-scratching »

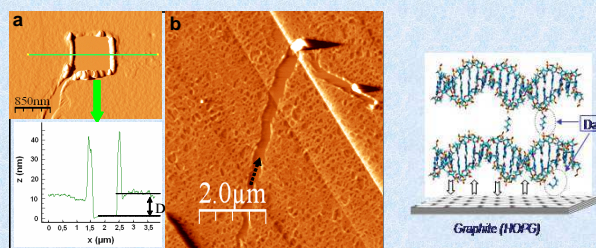


Figure (2) Image AFM obtenue en mode Tapping. a) illustre la méthode « AFM-scratching » utilisée pour mesurer l'épaisseur des dépôts. b) après le passage de la pointe AFM en mode contact.

Irradiation

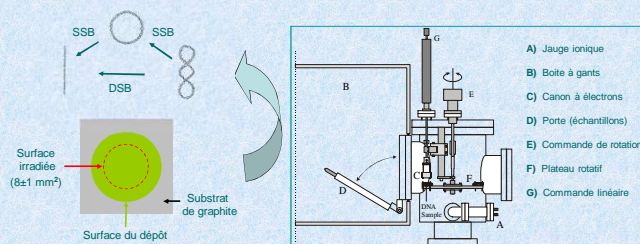


Figure (4) Schéma du système d'irradiation par EBEs. La figure présente les composants essentiels du système

Désorption d'anions négatifs

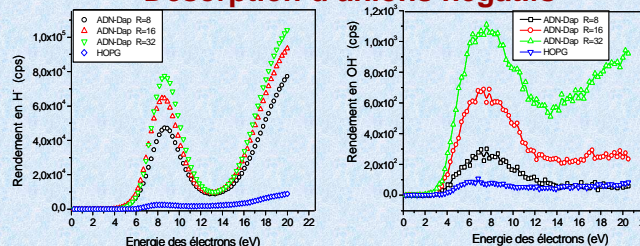


Figure (6) Spectres de rendement d'anions H^- et OH^- réalisés sur : un substrat de graphite vierge; un dépôt ADN-Dap avec un rapport $R = 8;16$ et 32 ($C_{\text{ADN}} = 20\text{ng}/\mu\text{l}$).

Perspectives

- De nombreux domaines de recherche peuvent bénéficier de cette méthode de dépôt et notamment ceux qui visent la compréhension des effets radio-induits sur le vivant.
- Dans notre domaine d'investigation (l'effet des EBEs), la méthode de dépôt proposée peut être utilisée pour l'identification de nouveaux agents radiosensibilisateurs (applications thérapeutiques).

Références

- Boudaiffa B., Cloutier P., Hunting D. J., Huels M. A., Sanche L., *Science*, **2000**, 287(5458), 1658-1660.
- Radmila Panajotovic, Martin F., Cloutier P., Hunting D., and Sanche L., *Rad. Res.*, **2006** 165, 452-459
- Boudaiffa B., Cloutier P., Hunting D., Huels M. A., and Sanche L., *Rad. Res.*, **2002** 157, 227-234